

Superoxide anion (O_2^-) content Kit

超氧阴离子试剂盒说明书

货号: G0116W | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、产品简介:

当生物体遭受外界胁迫时,生物体内超氧阴离子等活性氧大量产生和积累,可作为生物体氧化胁迫的信号。因此在逆境条件下生物体内超氧阴离子自由基的产生,可间接反映组织细胞受损状况和抗性强弱。超氧阴离子(O_2^-)与羟胺反应产生 NO_2^- , NO_2^- 在对氨基苯磺酸和 α -萘胺作用下,生成粉红色的偶氮染料,该染料在 540nm 处有最大光吸收,根据 A_{540} 值可计算出样品中的 O_2^- 的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	临用前,可依据待检测样本数量,把试剂二和试剂三等比例混合成无色的反应 mix (注意观察,若变粉色,则不能使用)。两天之内用完。
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、水浴锅、离心机、研钵、可调式移液器、冰、蒸馏水。

四、超氧阴离子(OFR)测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g),加入 1mL 提取液,冰浴匀浆,然后 12000rpm, 4℃,离心 10min,取上清作为粗体液,置于冰上待测。

【注】: a、可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

b、提取液尽快测定,请勿将样品进行长时间的低温保存,以免影响测定结果。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次); 12000rpm, 4℃,离心 10min,取上清液测定。

【注】: 若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清液检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min,调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

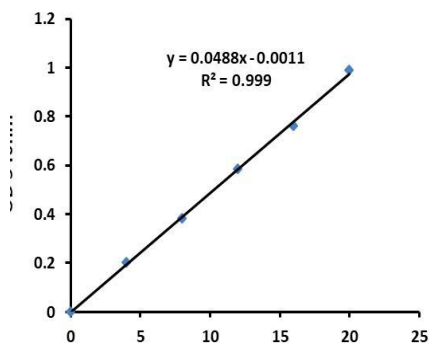
试剂名称 (μ L)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	100	
提取液		100
试剂一	100	100

混匀，37℃（可用恒温培养箱）反应 10min		
反应 mix	200	200
混匀，37℃反应 5min（准确时间），立即取出 200μL 至 96 孔板中（若浑浊可于 8000rpm 室温下离心 5min 后取 200μL 上清液），于 540nm 处检测读取吸光度 A， $\Delta A = A$ 测定-A 空白。		

【注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0488x - 0.0011$ ，x 是 NO_2^- 的摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0488] \div (V1 \div V \times W) \times 2 \times D \\ &= 410 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞计算：

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0488] \div (V1 \div V \times 500) \times 2 \times D \\ &= 410 \times (\Delta A + 0.0011) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0488] \div V1 \times 2 \times D = 410 \times (\Delta A + 0.0011) \times D$$

V---提取液的体积，1mL；

V1---加入反应体系的样品量，0.1mL；

W---样品鲜重，g；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

2---生成 1 个 NO_2^- 需要 2 个 O_2^- ；

标准品亚硝酸钠的分子量---69。